

令和元年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18711

研究課題名(和文) 中枢神経系炎症制御に関与するヒト腸内細菌の探索

研究課題名(英文) Identification of human-derived gut microbes involved in the inflammation in the central nerve system

研究代表者

宮内 栄治 (Miyuchi, Eiji)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：60634706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多発性効果症の発症にある種の腸内細菌が影響を与えることが示唆されてきた。とくに、マウスを用いた研究においては、いくつかの菌が中枢神経系の炎症に加担することが示されている。本研究では、ヒト由来腸内細菌を有するマウスから、中枢神経系炎症に関与するヒト腸内細菌を同定した。また、食事成分により腸内細菌叢を制御することで中枢神経系の炎症を抑制することができることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、多発性硬化症患者の腸内細菌叢は健常人とは異なるという報告が多くなされている。このことは、ある種の腸内細菌が中枢神経系に炎症に加担していることを示唆するとともに、腸内細菌叢を制御することで、多発性硬化症などの炎症疾患を抑制することを示唆している。本研究では中枢神経系炎症に関与するヒト腸内細菌を食事内容により制御できることを示した。今後、多発性硬化症患者に対し食事内容を整えることが治療に繋がるか、検討が望まれる。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that gut microbiota affects the development of multiple sclerosis, MS. Studies using a mouse model demonstrated that some microbes colonized in mice, such as filamentous bacteria (SFB), increase proinflammatory responses both in the intestine and central nerve system. In this study, we identified human-derived microbes which play a role in the inflammation in the spinal cords. In addition, we demonstrated that dietary ingredients, such as fibers, are able to modulate gut microbiota, and this leads to suppressive effects on the inflammation in the spinal cords.

研究分野：食品科学

キーワード：多発性硬化症 腸内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患などの腸疾患のみならず、腸以外の臓器における疾患にも腸内細菌が関与することが明らかになってきており、多発性硬化症 (Multiple sclerosis; MS) もその一つである。MS は、脳や脊髄といった中枢神経系の脱髄を伴う自己免疫疾患で、その症状は視覚障害や四肢の麻痺など多岐にわたる。発症原因は未だ十分に解明されていないが、遺伝的要因と環境的要因の両方が関与し、免疫応答の異常が惹起されると考えられている。MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) においては、無菌状態で飼育したマウスは MS 様症状が緩和されることが示されている (Lee, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2011; Berer et al., Nature, 2011)。また、segmented filamentous bacteria (SFB) といった腸管免疫系を大きく修飾することが知られる腸内細菌についても、中枢神経系炎症に加担することが示されている (Lee et al., 2011)。一方で、SFB 以外の腸内細菌種の関与も指摘されており (Berer et al., 2011)、不明な点が多く残されるのが現状であった。

マウスの研究のみならず、MS 患者の糞便菌叢解析の結果から、MS 患者が健常人とは異なる腸内細菌叢を有することが明らかになってきた。日本人の MS 患者の腸内細菌叢を解析した研究では、Clostridia クラスター XIVa や IV の減少が示された (Miyake et al., PLoS One 2015)。これらの菌は制御性 T 細胞誘導に関与しており、これらの菌の減少が炎症反応の促進に寄与する可能性が考えられる。実際、MS 患者と健常人の糞便をそれぞれ EAE マウスに移植した場合、MS 患者の糞便を移植したマウスの方が抑制性サイトカイン IL-10 の産生量が低く、より重篤な EAE を発症する (Berer et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2017; Cekanaviciute et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2017)。また、MS 患者で増加する腸内細菌として、いくつかのグループが共通して報告しているのが *Akkermansia* である (Berer et al., 2017; Cekanaviciute et al., 2017; Jangi et al., Nat Commun 2016)。*Akkermansia* は腸管上皮細胞が産生するムチンを分解する特徴をもち、肥満や糖尿病などとの関連について注目を集めている腸内細菌である。*Akkermansia* は 型免疫応答の活性化にも関与することが示唆されており、*Akkermansia* が MS の病態にも寄与している可能性がある。さらに、小規模なケースレポートではあるものの、MS 患者に対して健常人の腸内細菌を移植することで症状が緩和することも報告されている (PBorody et al., Am J Gastroenterol 2011)。

以上のように、中枢神経系炎症に関与する腸内細菌を特定し、その菌を制御することで MS の発症リスクを低減させるとともに、MS 患者の症状緩和にも繋がると考えられた。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、EAE マウスを用いた研究で中枢神経系炎症に加担するマウス常在菌を特定してきた。マウスに各種抗生剤を投与することにより人為的に腸内細菌叢を変動させ、中枢神経系炎症の程度と相関を示す腸内細菌種を解析することで関与菌を同定した。そこで、ヒト腸内細菌を有するマウスに対して同手法を用いることで、炎症惹起に関わるヒト腸内細菌を特定できると考えた。また、食事由来成分が腸内細菌叢に大きな影響を与えることが知られている。そこで、食事成分により腸内細菌叢を制御することで、中枢神経系の炎症を抑制できるかを検討する。とくに、上記で同定したヒト腸内細菌種や、すでに MS 患者で増加が確認されている腸内細菌種をターゲットとした制御法の探索を試みる。これらの検討により、腸内細菌をターゲットとした中枢神経系炎症反応の新規予防・治療法の確立に展開するための基盤を構築することを最終目的とした。

3. 研究の方法

健常人ボランティアから糞便を提供して頂き、採取から 15 分以内に嫌気条件下でグリセロールに懸濁し、ストックを作成した。無菌アイソレーター内で飼育したマウス (GF マウス) に健常人便サンプルを経口投与し、ヒト腸内細菌叢を有するマウスを作製した。本マウスを 20 週間飼育したが、炎症や衰弱といった異常所見はみられなかった。本マウスに Ampicillin または Vancomycin を含む飲水を 1 週間自由摂取させ、腸内細菌叢を人為的に攪乱しディスバイオーシスを誘導した。これらのマウスにミエリンペプチド (MOG) を免疫し、EAE を発症誘導した。EAE の症状は尾および四肢の麻痺をもとに毎日評価した。また、脊髄への炎症性 T 細胞浸潤をフローサイトメトリーで解析することにより、中枢神経系の炎症を解析した。免疫した MOG 特異的免疫応答は、脾臓または腸管粘膜固有層から採取した細胞を *in vitro* で MOG で再刺激した後、培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA で測定することで解析した。

また、Desai らの報告 (Desai et al., Cell 2016) に従い、ヒト腸内細菌 14 菌株のみを定着させたノトバイオートマウスを作製し試験に用いた。最小限の腸内細菌叢を構成する 14 菌株には、MS 患者の腸管で増加が報告されている *Akkermansia muciniphila* も含まれており、餌中の繊維量を変化させることで *A. muciniphila* の存在比を大きく変動させることができる (Desai et al., Cell 2016)。そこで、本ノトバイオートマウスに高繊維食または無繊維食を与えた後、上記と同様に EAE を発症誘導した。

マウス腸内容物または糞便から DNA を抽出し、16S rRNA の V4 領域を PCR により増幅した。得られたライブラリを次世代シーケンサー Miseq に供しシーケンシングを行った。取得したシーケンスデータは Mothur ソフトウェアを用いてフィルタリング、キメラ除去、アノテーション、および OTU 作成を行った。ノトバイオートマウスの菌叢解析では、定着させた 14 菌株の V4 領域

配列に対しシーケンスリードの分類を行った。

4. 研究成果

健康人の腸内細菌を有するマウスに EAE を発症誘導した結果、ほとんどのマウスが軽度の麻痺症状を示す程度であった。一方、Ampicillin(Amp)を投与しディスバイオーシスを誘導した結果、EAE の症状が顕著に増加することが明らかになった(図1)。このことから、腸内細菌のディスバイオーシスにより中枢神経系炎症が促進されたことを示唆された。また、小腸および大腸粘膜固有層単核球を単離し、MOG で再刺激した結果、Amp を投与したマウスの大腸で MOG 特異的サイトカイン産生の増加が確認された。そこで、本マウスの大腸内容物から DNA を抽出し菌叢解析をおこなった結果、Erysipelotrichaceae 科に属する菌のバランスが Amp 投与により変動することが明らかになった。ヒト糞便を投与したマウス糞便を各種選択培地に播種し、コロニーシーケンシングを行うことで、変化のみられた Erysipelotrichaceae 科菌株を 2 菌株単離することができた。これら 2 菌株を無菌マウスに定着させるとともに、Amp を自由摂取させることで 2 菌株のバランスを変動させた。その結果、やはり本 2 菌株のバランスが変動することで EAE の重篤度が変化することが示された。以上の結果から、ヒト腸内に常在する Erysipelotrichaceae 科の菌のバランスが変化することで、中枢神経系の炎症が促進されることが示唆された。Erysipelotrichaceae 科の菌は高脂肪食により増加することが報告されており、食事成分により制御することができると考えられる。今後、脂質により今回同定された菌株が制御されるのか、また、それにより炎症を抑制することができるのかが検討課題である。また、今回単離した菌株のゲノムシーケンスも完了しており、今後、作用機序の解明を試みる予定である。

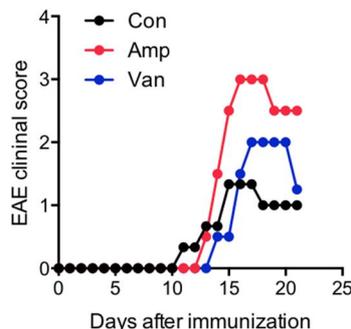


図1. ヒト腸内細菌を有するマウスのEAE臨床スコア

次に、ヒト腸内細菌 14 菌株のみの最小限腸内細菌叢を有するマウスを用いて解析をおこなった。

本マウスに高繊維食 (FR) または無繊維食 (FF) を与えた結果、無繊維食の摂取により *A. muciniphila* が顕著に増加した(図2)。*A. muciniphila* は MS 患者糞便で増加が確認されている菌であり、中枢神経系炎症への影響が考え

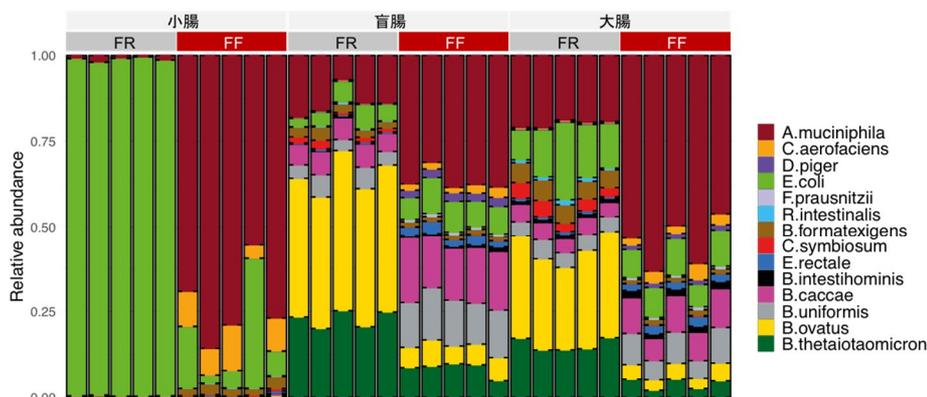


図2. 高繊維食 (FR) および無繊維食 (FF) を摂取したノトバイオームマウスの腸内細菌叢

られた。そこで、これらのマウスに EAE を発症誘導したところ、無繊維食を与えたマウスはより重篤な EAE を発症することが明らかになった(図3)。また、これらのマウスの脊髄に浸潤した T 細胞について解析した結果、無繊維食を摂取したマウスの脊髄ではエフェクタータイプの T 細胞数が増加しており、これらの細胞がより重篤な神経系のダメージに寄与していることが示唆された。以上の結果から、MS 患者で増加が確認されている *A. muciniphila* の腸管での増加が、中枢神経系での炎症促進に寄与していることが示唆された。一方、食事内容により *A. muciniphila* を制御することで炎症を抑制できる可能性も示された。つまり、食物繊維を多く含む食事により *A. muciniphila* の増加を抑制することで、中枢神経系炎症の緩和に繋がることが示唆され、今後、さらなる詳細な機序解明が期待される。

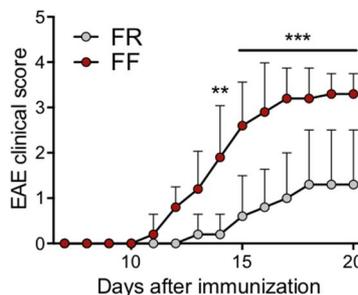


図3. 高繊維食 (FR) および無繊維食 (FF) を摂取したノトバイオームマウスのEAE臨床スコア

以上の研究から、中枢神経系炎症に関与するヒト腸内細菌を単離同定することができ、さらに食事成分によりこれらの菌株を制御することで、炎症抑制へ繋げることができる可能性を見出すことができた。近年、日本においても MS 患者が増加しているが、食生活を改善することで発症リスクを軽減できる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. 宮内栄治、大野博司、腸内細菌叢と腸管免疫、Precision Medicine、Vol.2、No.4、314-317、2019 (査読なし)
2. 宮内栄治、大野博司、多発性硬化症における腸内細菌の影響、実験医学、vol.32、No.2、303-307、2019 (査読なし)
3. 宮内栄治、大野博司、多発性硬化症におけるマイクロバイオームの役割、Vol.69、No.3、187-194、2018 (査読なし)
4. Okai S, Usui F, Ohta M, Mori H, Kurokawa K, Matsumoto S, Kato T, Miyauchi E, Ohno H, Shinkura R. Intestinal IgA as a modulator of the gut microbiota. Gut Microbes. 8: 486-492, 2017 (査読あり)
5. 宮内栄治、大野博司、腸内細菌と腸管免疫の相互作用、カレントセラピー、34(11): 1053-1058, 2016 (査読なし)
6. Okai S, Usui F, Yokota S, Hori-I Y, Hasegawa M, Nakamura T, Kurosawa M, Okada S, Yamamoto K, Nishiyama E, Mori H, Yamada T, Kurokawa K, Matsumoto S, Nanno M, Naito T, Watanabe Y, Kato T, Miyauchi E, Ohno H, Shinkura R. High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice. Nature microbiology. 1:16103, 2016 (査読あり)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Negishi H., Takeuchi T., Miyauchi E., Shimamoto S., Matsuyama A., and Ohno H. Microbiota-dependent and -independent induction of colonic regulatory T cells by butyrate. The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. 2018
2. Takeuchi T., Miyauchi E., Shimamoto S., Matsuyama A., and Ohno H. Gut microbial metabolite acetate tunes IgA reactivity toward commensal microbes to maintain mucosal homeostasis. The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. 2018
3. Takeuchi T., Miyauchi E., and Ohno H. Gut microbial metabolite acetate promotes bacteria-specific IgA production to maintain intestinal homeostasis. 2nd Korea-Japan Joint Meeting on Mucosal Immunology. 2018
4. Miyauchi E. and Ohno H. Small intestinal microbes act in concert to exacerbate autoimmune inflammation in the central nervous system. IMS-JSI International Symposium on Immunology 2018 "Checkpoint in medical science and its technology". 2018
5. Miyauchi E., Nakanishi K., Uchiyama K., Koido S., Arakawa H., Kawasumi M., Ito A., Ohkusa T. and Ohno H. The effects of smoking on gut ecosystem of patients with IBD. FALK Symposium 212. 2018
6. Eiji Miyauchi, Yumiko Sato, Kan Yamauchi, Shigeo Koido, Hiroshi Arakawa, Masami Kawasumi, Ayumi Ito, Toshifumi Ohkusa, Hiroshi Ohno. The effects of smoking on gut ecosystem in IBD. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017
7. Eiji Miyauchi, Seok-Won Kim, Hiroshi Ohno. Mimicry peptides from gut commensals stimulate myelin-specific T cells and exacerbate experimental autoimmune encephalomyelitis. 第 46 回日本免疫学会学術集会、2017
8. Eiji Miyauchi, Seok-Won Kim, Wataru Suda, Masahira Hattori, Todd D. Taylor, Hiroshi Ohno. The Role of Gut Microbiota in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. 18th International Congress of Mucosal Immunology. 2017
9. 宮内栄治、大野博司、多発性硬化症モデルマウスにおける腸内細菌の役割、第 39 回日本分子生物学会年会(招待講演)、2016

6 . 研究組織

- (1)研究分担者
- (2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。